



## Conservation d'une souche de *Cowdria ruminantium* par congélation

par J. RAMISSE et G. UILENBERG

### RESUME

Les auteurs ont réussi, en congelant rapidement *C. ruminantium* et en le conservant à  $-75^{\circ}\text{C}$  et à  $-180^{\circ}\text{C}$ , à le maintenir vivant. Ils ont utilisé comme anti-coagulant et avec un égal succès, le citrate de soude, le versène et l'héparine, et comme excipient de congélation le diméthylsulfoxyde à 10 p. 100. La conservation à  $-180^{\circ}\text{C}$ , en azote liquide, n'est en rien supérieure à celle à  $-75^{\circ}\text{C}$ , tout au moins dans les limites des délais expérimentés.

Il est indispensable de pouvoir conserver les souches de *Cowdria ruminantium* (COWDRY, 1925), cause de la maladie « heartwater », autrement que par passages continus sur animal sensible. Car jusqu'à maintenant seuls les ruminants ont été reconnus sensibles à la maladie. L'incubation étant de une à quelques semaines et les passages devant être faits au cours de l'accès thermique, cela implique que, pour la conservation in vivo, il faille utiliser un grand nombre d'animaux. Or à Madagascar le problème est assez aigu, car nous ne disposons, pour les expériences et les passages de souches, que d'un troupeau de mérinos importés spécialement à cet effet et tenus à l'abri de l'infection naturelle. Mais le nombre de têtes est restreint, d'où l'intérêt d'un autre mode de conservation.

Les tentatives d'adaptation de *C. ruminantium* aux animaux de laboratoire, ou à l'œuf embryonné, faites par d'autres auteurs et par nous-mêmes (et dont les résultats seront rapportés ailleurs), n'ont donné que des résultats décevants ou fragmentaires, ne permettant pas de compter sur ce procédé pour la conservation. De même pour les essais de conservation du sang infectieux en glycérine, saccharose, glucose, citrate, dextrose-gélatine, paraffine, ou par dessiccation sous vide au moyen du chlo-

rure de calcium (rapporté par ALEXANDER, 1931).

Par conséquent, les seuls moyens actuels de conservation demeurent :

- les passages continus sur ruminants;
- le stockage sur tiques vectrices (*Amblyomma* spp.);
- la congélation.

La congélation a déjà été employée avec succès par les chercheurs sud-africains (communication personnelle du Dr. W.O. NEITZ). Ils mélangent le sang volume pour volume avec une solution tampon citratée peptonée avant de le congeler. Par contre KARRAR (1960) n'a pas pu conserver l'infectiosité du sang citraté ou défibriné à  $-32^{\circ}\text{C}$ .

Ayant nous-mêmes, également, échoué dans l'adaptation du germe aux animaux de laboratoire, nous avons étudié les modalités de conservation par congélation, plus commode que le stockage sur tiques.

### MATERIEL ET METHODES

#### 1. Prélèvements congelés

Il s'agit de sang de mouton prélevé de 2 à 4 jours après le début de l'accès thermique.

Le sang infectieux est récolté sur anticoagulant ou défibriné sur billes de verre. Comme anticoagulant nous avons utilisé :

- l'héparine (1 mg/2 ml);
- le citrate de soude (0,25 p. 100);
- le versène (0,2 p. 100);
- un tampon citraté et peptoné dont la formule nous avait été indiquée par le Dr. W.O. NEITZ, d'Onderstepoort :
 

« $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . . . . .	1,36	g
- Lactose . . . . .	50	g
- Peptone bactériologique . . .	10	g
- Citrate de sodium . . . . .	10	g
- Eau distillée . . . . .	500	ml
- NaOH N/1 : quantité nécessaire pour ajuster au pH 7,0.		

Ce tampon est employé volume pour volume.

#### *Excipient de congélation*

Le sang a été congelé tel quel avec le produit anticoagulant seul, ou bien en ajoutant en plus un excipient de congélation : glycérol (10 p. 100) ou diméthyl-sulfoxyde ou DMSO (7,5, 10 ou 20 p. 100). Le sang est alors réparti, le plus rapidement possible après le prélèvement, en ampoules de 20 ml (5 ml de sang) ou de 10 ml (3 ml de sang). L'idée d'essayer le DMSO nous a été suggérée par la publication de FOGGIE et al. (1966), qui l'ont employé avec succès pour la congélation de la rickettsie de la « tick-borne fever » des ruminants.

## **2. Techniques de congélation et de conservation**

### *a) Congélation rapide*

Les ampoules sont scellées et immédiatement immergées, tout en étant soumises à un mouvement de rotation (centrifugeur spécial Usifroid), dans un mélange réfrigérant dont la température avoisine  $-70$  à  $-75^\circ\text{C}$  : mélange d'alcool préalablement refroidi au congélateur, et de neige carbonique. La congélation du sang projeté en couche mince (coquille) sur la paroi interne de l'ampoule est immédiate. Les ampoules sont alors placées dans un congélateur électrique (à  $-75^\circ$ ), ou dans l'azote liquide ( $-180^\circ$ ).

### *b) Congélation lente*

Les ampoules scellées sont refroidies progressivement à  $+4^\circ\text{C}$ , puis à  $-30^\circ$ , puis à  $-75^\circ$ . Pour que la congélation soit ralentie et progressive, les ampoules sont placées dans un coffre tapissé de plaques de polystyrène. La descente de température est ainsi très progressive. C'est ce mode de congélation que nous employons avec succès pour la conservation des souches cellulaires. Les ampoules ainsi refroidies sont ensuite stockées à  $-75^\circ$  ou à  $-180^\circ$ .

## **3. Décongélation et inoculation de la souche**

La décongélation, après des durées variables de conservation, est très rapide, par immersion des ampoules dans de l'eau à  $38-40^\circ\text{C}$ . Nous avons observé qu'à la décongélation le sang est presque entièrement hémolysé, même en présence d'excipient protecteur. Le produit décongelé est, le plus vite possible, inoculé à un mouton par voie veineuse (5 à 10 ml de sang).

Il a toujours été vérifié qu'une réaction thermique éventuelle était bien due à la cowdriose, soit par examen du cortex cérébral après la mort, soit par passage de sang à d'autres ruminants sensibles ou bien par l'épreuve d'une seconde inoculation de sang infectieux (non congelé) en cas de guérison. Dans les cas où il n'y avait pas de réaction, il a également été vérifié par une seconde inoculation que le mouton était bien sensible à l'infection.

## **RESULTATS**

Ils sont résumés dans le tableau suivant :

## **CONCLUSIONS**

De l'examen de ce tableau il ressort que l'infectiosité du sang peut être conservée par congélation, mais il faut respecter, pour une bonne conservation, un certain nombre d'impératifs :

*Anticoagulants* : Citrate, versène et héparine nous ont donné des résultats comparables. Le tampon citraté d'Onderstepoort a été utilisé dans des conditions défavorables dans un cas (glycérol comme excipient et congélation lente).

Anticoagulant	Excipient de congélation (p. 100)	Mode de congélation	Température de conservation	Délai de conservation	Résultat de l'inoculation
Définé	-	Rapide	-180°	14 jours	0
Versène	-	Rapide	-180°	14 jours	0
Tampon citaté	-	Rapide	-180°	14 jours	0
Définé	Glycérol : 10	Lente	- 75°	37 jours	0
Versène	Glycérol : 10	Lente	- 75°	37 jours	0
Tampon citaté	Glycérol : 10	Lente	- 75°	37 jours	- (x)
Citrate	DMSO : 7,5	Lente	- 75°	5 jours	0
Héparine	DMSO : 7,5	Lente	- 75°	5 jours	0
Héparine	DMSO : 20	Rapide	- 75°	10 jours	0
Héparine	DMSO : 20	Rapide	- 75°	33 jours	0
Citrate	DMSO : 10	Rapide	- 75°	64 jours	+
Versène	DMSO : 10	Rapide	- 75°	100 jours	+
Héparine	DMSO : 10	Rapide	-180°	13 jours	+
Héparine	DMSO : 10	Rapide	- 75°	20 jours	+
Héparine	DMSO : 10	Rapide	-180°	39 jours	+
Héparine	DMSO : 10	Rapide	- 75°	2 mois	+
Héparine	DMSO : 10	Rapide	-180°	2 mois	+
Héparine	DMSO : 10	Rapide	- 75°	4 mois	0 (xx)
Héparine	DMSO : 10	Rapide	- 75°	4 mois	0 (xx)
Héparine	DMSO : 10	Rapide	- 75°	5	+
Héparine	DMSO : 10	Rapide	-180°	5	+
Héparine	DMSO : 10	Rapide	- 75°	8 mois	+
Héparine	DMSO : 10	Rapide	- 75°	13 mois	+

(x) Le sang est coagulé après décongélation et inutilisable.

(xx) Résultats que nous ne considérons pas comme concluants : le sang ayant donné ces deux résultats négatifs a pu être décongelé par une panne du congélateur pendant notre absence prolongée; de telles pannes se sont produites auparavant et ces deux prélèvements avaient été congelés et décongelés en même temps.

*Excipient de congélation :* Le glycérol apparaît nocif, tout comme pour la rickettsie de la « tick-borne fever » des ruminants, qu'il peut détruire à la température du laboratoire avant ou après la congélation (FOGGIE et al., 1966). Mais il est nécessaire d'ajouter du DMSO, et à la concentration de 10 p. 100.

*En congelant très rapidement* (rotation des ampoules dans le bain réfrigérant) et en décongelant rapidement, les résultats ont été régulièrement positifs (à deux exceptions douteuses près, voir le tableau). Nous n'avons pas expérimenté le délai entre la décongélation et l'ino-

culation pendant lequel le sang conserve son infectiosité; le sang décongelé a toujours été mis sous glace (0° C) sitôt la décongélation, et inoculé de 15 à 30 minutes plus tard. La conservation à — 75° paraît aussi bonne qu'à — 180°, tout au moins pour les délais de conservation expérimentés. Le congélateur électrique peut tomber en panne; la souche est alors détruite. Mais avec l'azote liquide il faut veiller à régulièrement remplir le container, faute de quoi la souche risque aussi de se décongeler.

Laboratoire Central de l'Elevage,  
Tananarive.

## SUMMARY

### *Cowdria ruminantium* preservation by freezing

The authors have succeeded in maintaining *C. ruminantium* alive, by freezing the germ rapidly and preserving it at  $-75^{\circ}\text{C}$  and  $-180^{\circ}\text{C}$ . They have used as anti-clotting agents, with equal success, sodium citrate, versene and heparin, and as protective agent dimethylsulphoxide at 10 p. 100. Preserving at  $-180^{\circ}\text{C}$ , in liquid nitrogen, does not give better results as at  $-75^{\circ}\text{C}$ , at least for the periods that were tested.

## RESUMEN

### Conservación de una cepa de *Cowdria ruminantium* por congelación

Los autores acertaron mantener *C. ruminantium* vivo, congelandole rápidamente y conservandole a  $-75^{\circ}\text{C}$  y  $-180^{\circ}\text{C}$ . Utilizaron como anticoagulante y con un éxito igual el citrato de sodio, el verseno y la heparina y como excipiente de congelación el dimetil sulfoxido a 10 p. 100. La conservación a  $-180^{\circ}\text{C}$ , en nitrógeno líquido, no es superior a la a  $-75^{\circ}\text{C}$ , por lo menos en los límites de los términos experimentados.

## BIBLIOGRAPHIE

ALEXANDER (R.A.), « Heartwater - The present state of our knowledge of the disease », 17 th Rept Dir. Vet. Serv., South Africa, Part I, 1931 : 89-150.  
FOGGIE (A.), LUMSDEN (W.H.R.) et McNEIL-LAGE (G.J.C.), « Preservation of the infectious

agent of tick-borne fever in the frozen state », *J. comp. Path.*, 1966, 76 : 413-416.

KARRAR (G.), « Rickettsial infection (heart-water) in sheep and goats in the Sudan », *Brit. vet. J.*, 1960, 116 : 105-114.